



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU



Avaliação de diferentes modelos de indução do diabetes moderado em ratas Wistar e suas repercussões no organismo materno-fetal

**Lívia Luz Souza Nascimento**

**BOTUCATU/SP**

**2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU



Avaliação de diferentes modelos de indução do diabetes moderado em ratas Wistar e suas repercussões no organismo materno-fetal

Lívia Luz Souza Nascimento

Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno  
Orientadora

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas

**BOTUCATU/SP**

**2014**

## Sumário

Resumo.....	4
1. Introdução.....	6
2.1 Animais .....	8
2.2 Acasalamento .....	8
2.3 Grupos Experimentais .....	8
- STZ0/Acas90: ratas com diabetes induzido no dia do nascimento (D0) e acasalamento ao 90º dia de vida.....	8
- STZ4/Acas90: ratas com diabetes induzido no 5º dia do nascimento (D4) e acasalamento ao 90º dia de vida.....	8
- STZ0/Acas120: ratas com diabetes induzido no dia do nascimento (D0) e acasalamento ao 90º dia de vida.....	8
- STZ4/Acas120: ratas com diabetes induzido no 5º dia do nascimento (D4) e acasalamento ao 120º dia de vida .....	8
2.4 Indução do diabetes moderado nas ratas .....	9
2.5 Glicemia .....	10
2.6 Prenhez.....	10
2.6.1 Ingestão de água e de ração.....	10
2.6.2 Peso e Glicemia .....	10
2.6.3 Teste Oral de Tolerância à glicose (TOTG) e Teste de Tolerância à Insulina (TTI).....	10
2.6.4 Laparotomia .....	11
2.6.4.1 Desempenho reprodutivo materno.....	11
2.6.4.2 Pesagem dos recém-nascidos e placentas .....	11
2.6.4.3 Classificação dos pesos dos recém-nascidos.....	11
2.7 Análise Estatística .....	11
3. Resultados e Discussão.....	12
3.1 Dados relacionados até o desmame .....	12
3.2 Glicemias até 90 dias de vida.....	15
3.3 Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) aos 90 dias de vida .....	16
3.4 Prenhez.....	17
3.4.1 Glicemia.....	17
3.4.2 Peso Corpóreo .....	18
3.4.3 Consumo de água e ração .....	19
3.4.4 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) .....	21
3.4.5 Teste de Tolerância à Insulina (TTI) .....	22
3.5 Desempenho reprodutivo materno .....	23
3.6 Peso Fetal e Eficácia placentária.....	24
4. Conclusão.....	26
Referências.....	27

## Resumo

*Diabetes mellitus* (DM) é uma doença crônica na qual a homeostase da glicose está comprometida, levando a um quadro hiperglicêmico que pode gerar outras complicações. A insulina, hormônio produzido pelo pâncreas, está diretamente relacionada à morbidade, por ser um dos principais mecanismos de regulação da glicemia. DM pode ser apresentar três classes: I) Tipo 1 (DM1), quando as células beta ( $\beta$ )-pancreáticas, produtoras de insulina, são destruídas de forma auto imune. II) Tipo 2 (DM 2), quando há deficiência na excreção ou ação da insulina e III) DM Gestacional, quando o quadro hiperglicêmico é diagnosticado pela primeira vez durante a gestação. Por motivos éticos e de controle de variáveis, modelos animais são utilizados para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no diabete. Para isso, existem diferentes modelos de indução em animais como o uso diferentes tipos de agentes  $\beta$ -citotóxicos, doses e vias para mimetizar a condição hiperglicêmica. Visando obter um modelo que apresente maior similaridade com o quadro diabético em humanos, este estudo avaliou e comparou diferentes modelos de indução do diabete de intensidade glicêmica moderada em ratas Wistar. Foram testados neste estudo quatro modelos em ratas Wistar com a administração de droga  $\beta$ -citotóxica, o *streptozotocin* (STZ) em diferentes momentos do período neonatal: 1) Administração de STZ no 1º dia de vida (D0) e acasalamento ao 90º dia de vida; 2) Administração de STZ no 4º dia de vida (D4) e acasalamento ao 90º dia de vida; 3) Administração de STZ no D0 e acasalamento ao 120º dia de vida e 4) Administração da STZ no D4 e acasalamento ao 120º dia de vida. Foram avaliados a eficiência da produção de animais diabéticos, a glicemia pós-prandial antes e durante a prenhez, performance no Teste de Tolerância à Glicose (TOTG), Teste de Tolerância a Insulina (TTI), desempenho reprodutivo materno, e peso fetal e eficiência placentária. Os animais induzidos no D4 apresentaram maior intolerância à glicose no TOTG no período pré-prenhez. Além disso, o grupo induzido no D4 apresentou menor perda de animais após o tratamento com STZ. Na prenhez, os parâmetros maternos não variaram entre os grupos, porém a perda pós-implantação foi maior nos animais induzidos neste grupo. O modelo 4 mostrou maior número de fetos pequenos para idade de prenhez e menor eficiência placentária, sugerindo que os fetos deste modelo sofram de maior restrição de crescimento intra uterino.

Portanto, o modelo de indução ao diabetes no D4 com acasalamento aos 120 dias de vida mostrou-se mais representativo em relação aos parâmetros encontrados no DMG clínico.

**Palavras-chave:** *diabetes, streptozotocin, ratas, prenhez, fetos*

## 1. Introdução

*Diabetes mellitus* (DM) é doença crônica causada pela supressão ou inatividade do hormônio insulina. A insulina é um hormônio anabólico responsável pela homeostase da glicose, e é produzida pelas células beta ( $\beta$ ) do pâncreas (AMERICAN ASSOCIATION OF DIABETES, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde, existem 347 milhões de portadores de DM em todo o mundo e a doença é responsável por 5% dos óbitos anuais. DM pode ser dividido em três classes: 1) Diabete Tipo 1 (DM1), no qual as células  $\beta$  do pâncreas sofrem destruição autoimune e, portanto, são incapazes de liberar volumes adequados de insulina para o controle glicêmico. A reposição de insulina exógena é vital neste caso. 2) Diabete Tipo 2 (DM2), que corresponde a aproximadamente a 90% dos casos. Neste tipo, existe secreção da insulina pelas células pancreáticas, mas há redução na resposta dos tecidos periféricos ao hormônio ou ineficácia na ação do hormônio e 3) DM Gestacional (DMG), quando o quadro de intolerância à glicose é diagnosticado pela primeira vez durante a gravidez, podendo persistir ou não, após o parto. Existem aproximadamente 200 mil casos por ano de DMG, o que corresponde a 7% das gestações no mundo todo. A resistência insulínica é um mecanismo fisiológico no terceiro trimestre da gestação (RYAN; ENNS), confirmada através de teste oral ou intravenoso de tolerância a glicose. Dentre os possíveis fatores de risco relacionados ao DMG, destaca-se, a obesidade, histórico familiar e idade avançada (NEELAKANDAN; SETHU, 2014).

Devido a questões éticas e de controle de variáveis, é necessário o uso de animais de experimentação no estudo das causas e tratamento do diabete. A escolha apropriada do modelo animal que reproduza as condições diabéticas é extremamente relevante. Existem diversos trabalhos na literatura que relatam a indução do diabete de intensidade moderada em ratas para mimetizar a glicemia apresentada pelo DM 2 e pelo DMG. Portha *et al.* (1974) foram os primeiros a descrever o modelo de diabete moderado (glicemia entre 120 a 360 mg/dL) utilizando a droga  $\beta$ -citotóxica *streptozotocin* (STZ) em ratos durante o período neonatal. Este modelo mimetiza a glicemia e as complicações do DM2 e DMG. A literatura mostra que existem diferentes modelos de indução do diabete, dentre eles a administração de STZ no dia do nascimento (PORTHA *et al.*, 1979) (PORTHA; KERGOAT, 1985) (ROLO; PALMEIRA, 2006) (IESSI *et al.*, 2010) (SINZATO *et al.*,

2011), após o nascimento (BONNER-WEIR et al., 1981) (WANG et al., 1996) ou com cinco dias de vida (WANG et al., 1996) (MURALI, B; GOYAL, 2001) (KISS et al., 2009). *Streptozotocin* (STZ) é um antibiótico que vem sendo amplamente utilizado na indução do diabetes em animais de experimentação. A droga causa a degranulação das células  $\beta$ , levando-as à necrose, conseqüentemente, ao quadro de hipoinsulinemia e hiperglicemia (LENZEN, 2008)

Em nosso laboratório, foi verificado que o diabetes de intensidade moderada, induzido no período neonatal (dia 0), alterou a glicemia materna no início da prenhez, o que por sua vez, deflagrou alterações no organismo materno e no desenvolvimento inicial do embrião, afetando sua implantação e futuro desenvolvimento placentário e fetal (SINZATO, 2009). Quando a administração de STZ foi realizada no 5º dia de vida, os resultados mostraram que os níveis de glicose sanguínea foram favoráveis para a caracterização do modelo de diabetes moderado. Contudo, esses animais não apresentaram alterações na *performance* reprodutiva quanto ao número de implantações, taxas de perdas embrionárias em relação aos animais não-diabéticos (KISS et al., 2009). Além do período de administração da STZ para induzir o diabetes moderado, a idade dos animais no início do experimento também pode interferir nos resultados encontrados. Damasceno *et al.* (2013) descreveram que, independentemente da dose e via de administração do STZ no período neonatal de ratos, a hiperglicemia é transitória e os pesquisadores devem eleger o modelo de indução do diabetes moderado que seja mais adequado às variáveis a serem estudadas. Visando obter um modelo que apresente maior similaridade com o quadro diabético (DM2 e DMG) em humanos, este estudo pretende avaliar e comparar diferentes modelos de indução do diabetes de intensidade glicêmica moderada em ratos Wistar e suas repercussões no organismo materno-fetal.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar, machos e fêmeas, obtidos do CEMIB (Universidade Estadual de Campinas UNICAMP) e mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade ( $70 \pm 10\%$ ), ciclo claro/escuro (12h), água filtrada e ração *ad libitum*.

### 2.2 Acasalamento

Os animais foram acasalados para obtenção de recém-nascidos (RN) em nosso laboratório de pesquisa. Durante a fase de acasalamento, um macho e três fêmeas foram mantidos na mesma caixa durante o período noturno. Nas manhãs seguintes, os machos foram separados e o esfregaço vaginal foi realizado. Hastes flexíveis com extremidades envoltas em algodão embebido em água filtrada foram colocadas no canal vaginal das ratas e, posteriormente, depositadas sobre lâminas de vidro para a leitura em microscópio óptico. Na presença de espermatozóides, este era considerado o dia 0 (zero) de prenhez.

### 2.3 Grupos Experimentais

- **STZ0/Acas90:** ratas com diabetes induzido no dia do nascimento (D0) e acasalamento ao 90º dia de vida
- **STZ4/Acas90:** ratas com diabetes induzido no 5º dia do nascimento (D4) e acasalamento ao 90º dia de vida
- **STZ0/Acas120:** ratas com diabetes induzido no dia do nascimento (D0) e acasalamento ao 90º dia de vida
- **STZ4/Acas120:** ratas com diabetes induzido no 5º dia do nascimento (D4) e acasalamento ao 120º dia de vida



## 2.4 Indução do diabetes moderado nas ratas

Os recém-nascidos (RN) foram obtidos por parto vaginal. Foram mantidos oito RN por mãe sendo que as fêmeas tiveram prioridade, pois são o objeto de estudo. Os animais restantes foram submetidos à eutanásia com injeção de tiopental sódico (Thiopentax® - 50mg/Kg) por via intraperitoneal. As diferentes ninhadas foram distribuídas aleatoriamente nos quatro grupos. Os RN fêmeas dos grupos com indução do diabetes ao nascimento (Grupos STZ0/Acas90 e STZ0/Acas120) foram submetidas à injeção subcutânea de *streptozotocin* (STZ, SIGMA Chemical Company, St. Louis, Millstone) diluída em tampão citrato (0,1M, pH 4,5) na dose de 100 mg/kg. O critério de inclusão para compor os grupos STZ0/Acas90 e STZ0/Acas120 foi glicemia maior que 400 mg/dL no 4º dia de vida. A determinação glicêmica foi realizada por punção na extremidade da cauda para obtenção de uma gota de sangue, que foi depositada em glicofita e lida em glicosímetro convencional (*OneTouch Ultra, Johnson & Johnson*®). Todos os RN foram mantidos com suas mães até o período de desmame (22 dias de vida).

Os RN fêmeas dos grupos com indução do diabetes no quarto dia de vida (Grupos STZ4/Acas90 e STZ4/Acas120) foram submetidos à injeção intraperitoneal de STZ na dose de 70 mg/kg. O critério de inclusão para compor os grupos induzidos no quarto dia de vida foi o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) no 90º dia de vida. Para os grupos induzidos ao nascimento o TOTG foi usado como critério de exclusão.

Após a administração de STZ, as ratas foram observadas diariamente para registro do sucesso frente à indução do diabetes com relação à taxa de mortalidade.

Para realização do TOTG, após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue por punção venosa na cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Logo após, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. A glicemia das ratas foi mensurada após 30, 60 e 120 minutos. Foram consideradas ratas com diabetes moderado aquelas que obtiveram glicemia acima de 140 mg/dL em pelo menos dois pontos da

curva. As ratas que não atingiram glicemia acima de 140 mg/dL em pelo menos dois pontos da curva foram submetidas à eutanásia e excluídas do estudo.

## **2.5 Glicemia**

Nos dias 15, 30, 60 e 90 de vida, as glicemias foram mensuradas colhendo-se uma gota de sangue por punção na parte distal da cauda de cada rata com o uso de agulha. A gota foi depositada em glicofita, a qual foi lida em glicosímetro convencional para determinação glicêmica e os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

## **2.6 Prenhez**

De acordo com o grupo determinado no início do experimento, os animais foram acasalados com 90 ou 120 dias de vida. O acasalamento foi realizado da mesma forma descrita anteriormente (Item 2.2).

### **2.6.1 Ingestão de água e de ração**

Durante o período de prenhez, foi verificada a ingestão de água e de ração das ratas nos dias 2, 5, 8, 11, 14, 17 e 20 de prenhez.

### **2.6.2 Peso e Glicemia**

Durante a prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais. Nos dias 0, 7, 14 e 21 de prenhez, peso e glicemia das ratas foram registrados. As glicemias foram por glicosímetro convencional e os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL).

### **2.6.3 Teste Oral de Tolerância à glicose (TOTG) e Teste de Tolerância à Insulina (TTI)**

No 15º dia de prenhez, foi realizado o Teste de Tolerância à Insulina (TTI). Para esse teste, os animais foram submetidos ao jejum de 6 horas e, posteriormente, foi administrada uma solução de insulina na dose de 0,3 U/kg (*Lilly, France S.A.S., Fegersheim, França*) via subcutânea. A glicemia foi mensurada imediatamente antes da administração da insulina e 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de insulina. No 17º dia de prenhez, foi realizado o TOTG utilizando a

mesma metodologia realizada aos 90 dias de vida (Item 2.4). Os critérios de exclusão anteriores também foram válidos nessa fase para o TOTG.

## **2.6.4 Laparotomia**

### **2.6.4.1 Desempenho reprodutivo materno**

O útero foi exteriorizado, pesado e feita a análise do desempenho reprodutivo (peso da ninhada, contagem do número de implantações embrionária, mortes embrionárias e de fetos vivos e mortos). Foram calculadas as taxas de perdas pré e pós-implantação (DAMASCENO et al., 2008). Os ovários foram retirados para contagem dos corpos lúteos, como parâmetro indireto do número de ovulações.

### **2.6.4.2 Pesagem dos recém-nascidos e placentas**

Os fetos e suas respectivas placentas foram retirados e pesados individualmente.

### **2.6.4.3 Classificação dos pesos dos recém-nascidos**

Cada recém-nascido foi pesado individualmente para posterior classificação em pequeno (PIP), adequado (AIP) ou grande (GIP) para a idade de prenhez. A fórmula para obtenção dos limiares entre os grupos é dada pela média do grupo controle  $\pm$  desvio padrão  $\times$  1,7 (H et al., 2000). Em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, o grupo controle apresentou média dos pesos de recém-nascidos de 5,72g com desvio padrão de 0,36g. Dessa forma, serão classificados em PIP, recém-nascidos com peso inferior a 5,11g e em GIP com peso superior a 6,33. Animais com peso entre esses valores serão classificados em AIP.

A Eficácia Placentária foi calculada dividindo o peso do feto pelo peso da placenta do mesmo feto.

## **2.7 Análise Estatística**

Para análise estatística dos dados, foi testada a homogeneidade e normalidade da amostra pelo pacote estatístico GraphPad InStat 2.1. Os resultados foram expressos em médias aritméticas e desvios-padrão. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para a comparação entre os grupos para os dados com

distribuição normal. Quando o teste revelou diferença estatisticamente significativa, a análise foi complementada com o teste t de Student com a correção de Bonferroni. A correção de Welch foi utilizada para amostras com variâncias diferentes. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado. Os testes foram adequados quando as amostras foram pareadas. Para comparação de proporções foi utilizado o teste de Qui-quadrado e adotado o nível de significância de 5%.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Dados relacionados até o desmame

A indução do diabetes no D0 apresentou baixa eficácia devido à alta mortalidade e ao elevado número de animais que não atenderam o critério de inclusão (glicemia maior que 400 mg/dL no quinto dia de vida). Dos 160 animais que receberam a injeção de 100 mg/kg de STZ, 67 morreram antes do desmame e 53 não atenderam ao critério de inclusão. Dos animais induzidos, apenas 40 (24%) sobreviveram ao período de desmame e atenderam ao critério de inclusão do grupo. Na idade adulta, dos 40 animais que atenderam ao primeiro critério de inclusão, um morreu e 39 foram submetidos ao TOTG como segundo critério de inclusão. Destes, 14,7% deles, foram excluídos do experimento (Figura 1). A indução do diabetes nas ratas no D4 mostrou-se mais eficaz visto que, de 48 ratas induzidas, apenas 7 vieram a óbito antes do desmame. O critério de inclusão destes animais foi o teste oral de tolerância glicose no 90º dia de vida, o qual excluiu 5,2% dos animais deste grupo. (Figura 2)

As mortes seguidas do tratamento com STZ são justificadas devido aos efeitos tóxicos causados por esse análogo da glicose ao pâncreas que causa alquilação do DNA (LENZEN, 2008) levando à necrose das células beta e à deficiência grave de insulina em alguns animais. Quando acontece essa diminuição acentuada dos níveis de insulina, a entrada da glicose nas células fica prejudicada levando à hiperglicemia e, como consequência, a um quadro de cetoacidose metabólica com morte dos animais.

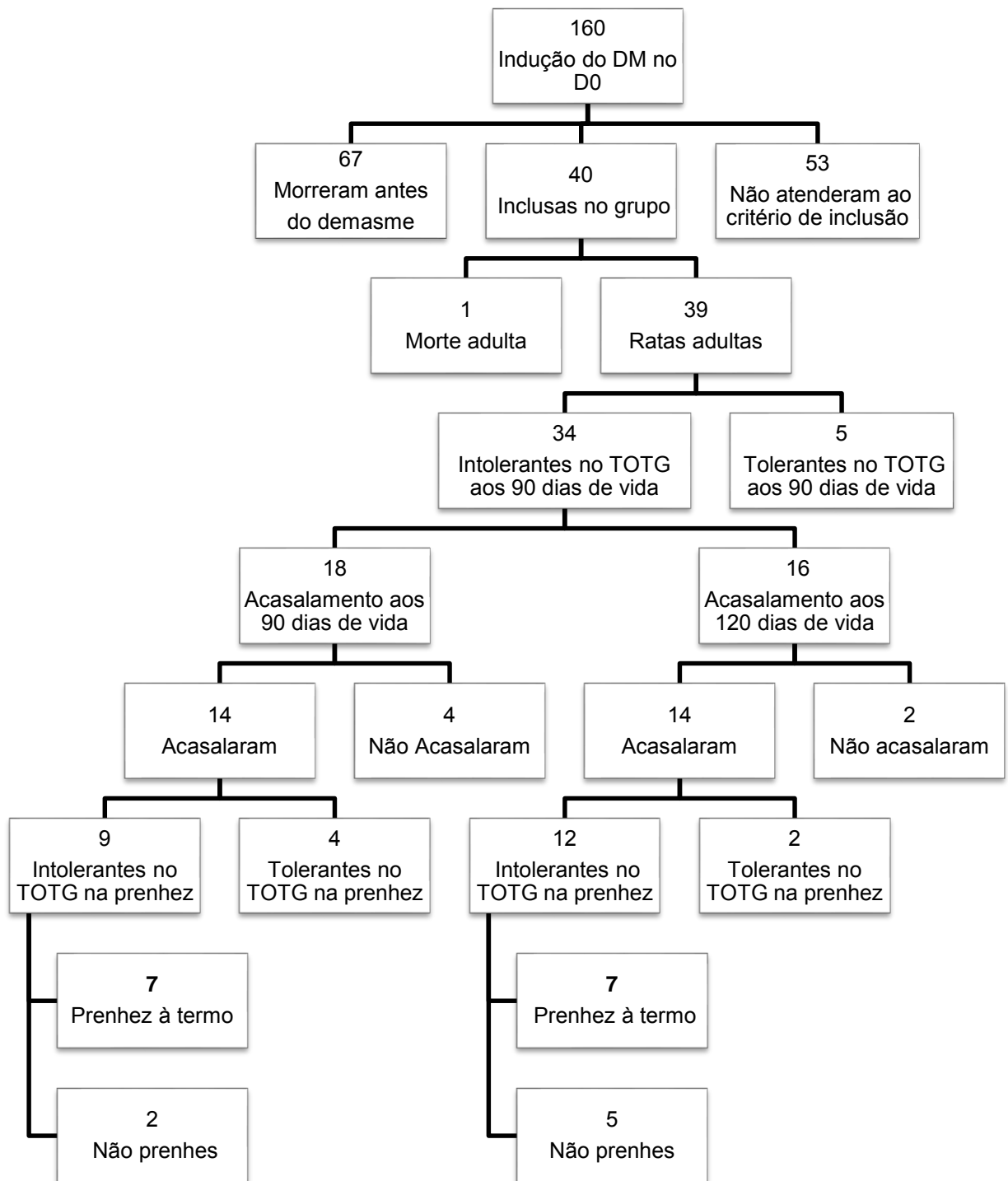


Figura 1 Número de ratas Wistar com DM induzido no D0 e em cada momento da sequência experimental.

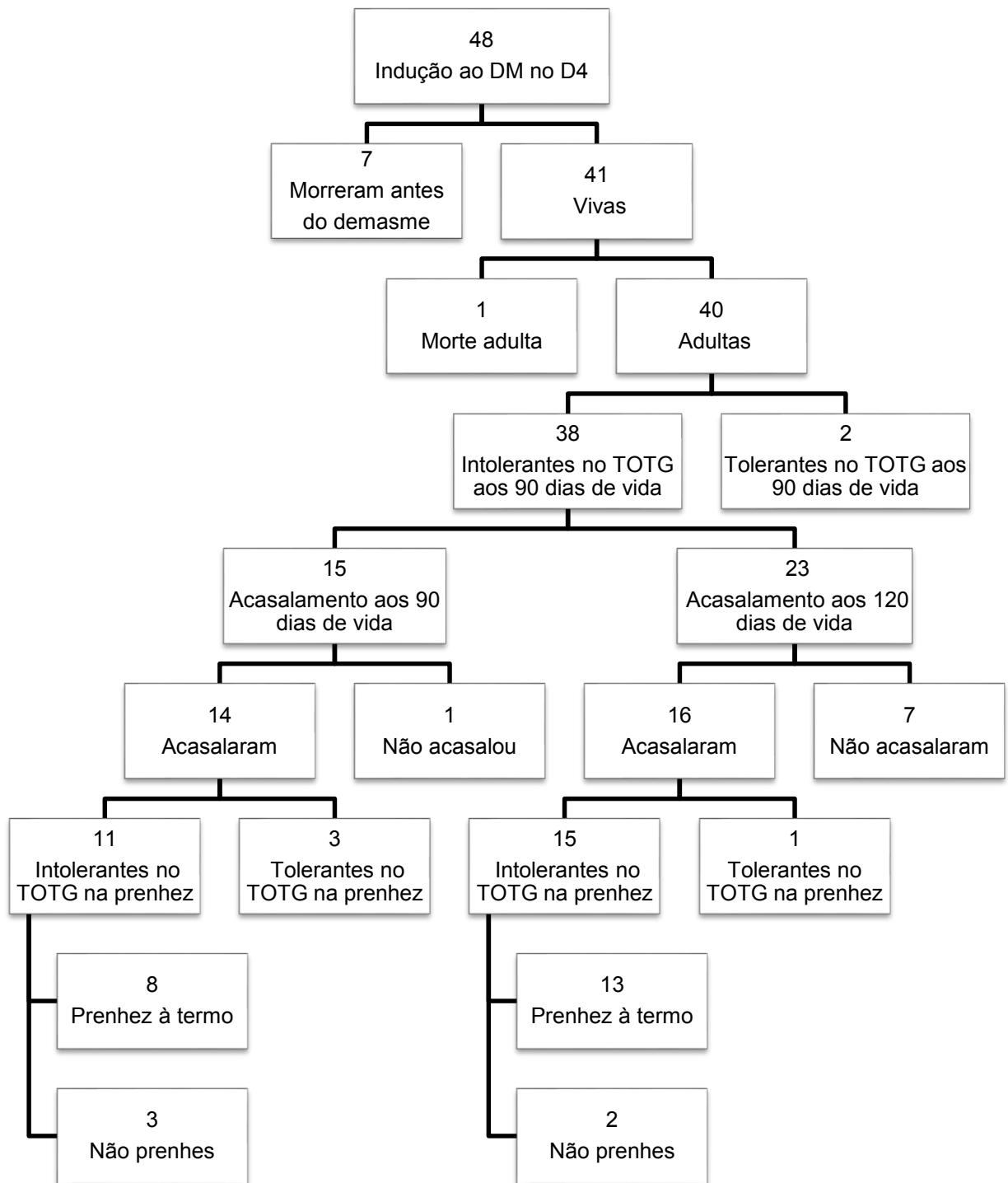


Figura 2. Número de ratas Wistar com DM induzido no D4 e em cada momento da sequência experimental.

### 3.2 Glicemias até 90 dias de vida

Na Figura 3 podemos observar a evolução da glicemia até o 90º dia de vida dos animais em ambos os grupos experimentais. A Figura 3A mostra que o grupo STZ0 apresentou diminuição da glicemia nos dias 60 ( $122,02 \pm 29,1$  mg/dL) e 90 de vida ( $112,68 \pm 16,07$  mg/dL) em relação aos 15 ( $132,36 \pm 18,7$  mg/dL) e 30 dias de vida ( $133,75 \pm 29,79$  mg/dL). As ratas com diabetes induzido no D4 de vida (Figura 3B) apresentaram redução da glicemia no dia 30 ( $130,21 \pm 22,89$  mg/dL) em relação ao 15º dia de vida ( $153,43 \pm 27,59$  mg/dL). No entanto, diferentemente do encontrado no grupo STZ0, as ratas do grupo STZ4 apresentaram aumento da glicemia no dia 60º dia de vida ( $144,66 \pm 37,39$  mg/dL) e redução 90º dia ( $123,7 \pm 18,81$  mg/dL). Os roedores apresentam regeneração das células beta-pancreáticas quando expostos ao STZ durante o período neonatal (MINAMI; SEINO, 2008)(BONNER-WEIR; WEIR, 2005). Essa regeneração pode explicar a queda da glicemia no 30º dia de vida, já no 60º dia de vida, a regeneração pode ter sido ineficiente para a demanda de insulina neste período.

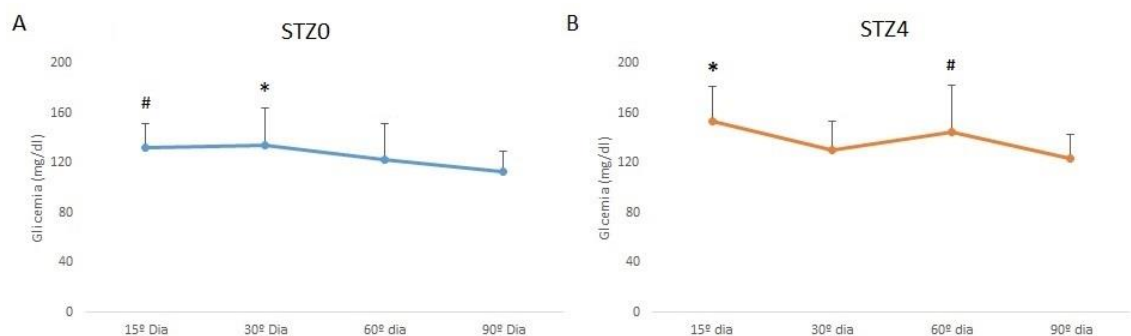


Figura 3. A. Glicemias nos dias 15, 30, 60 e 90 de vida do grupo STZ0. \* Diferença estatisticamente significativa entre a glicemia do dia 30 e as glicemias dos dias 60 e 90 de vida. # Diferença estatisticamente significativa entre a glicemia do dia 15 e do dia 90 de vida (ANOVA seguido de teste t e correção de Bonferroni  $p < 0,05$ ). B. Glicemias nos dias 15, 30, 60 e 90 de vida do grupo STZ4. \* Diferença estatisticamente significativa da glicemia do dia 15 comparada com as glicemias dos dias 30 e 90 de vida. # Diferença estatisticamente significativa da glicemia do 60º dia de vida comparada com o 90º dia de vida (ANOVA seguido de teste t e correção de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

Quando comparamos os grupos experimentais (Figura 4), foi observada diferença significativa nos dias 15 e 60 de vida com aumento da glicemia no grupo STZ4 em relação ao grupo STZ0, mostrando que a capacidade de regeneração

pancreática observada entre os grupos foi diferente nos dois modelos. A regeneração no grupo STZ4 pode não ter sido tão eficaz quanto no STZ0.

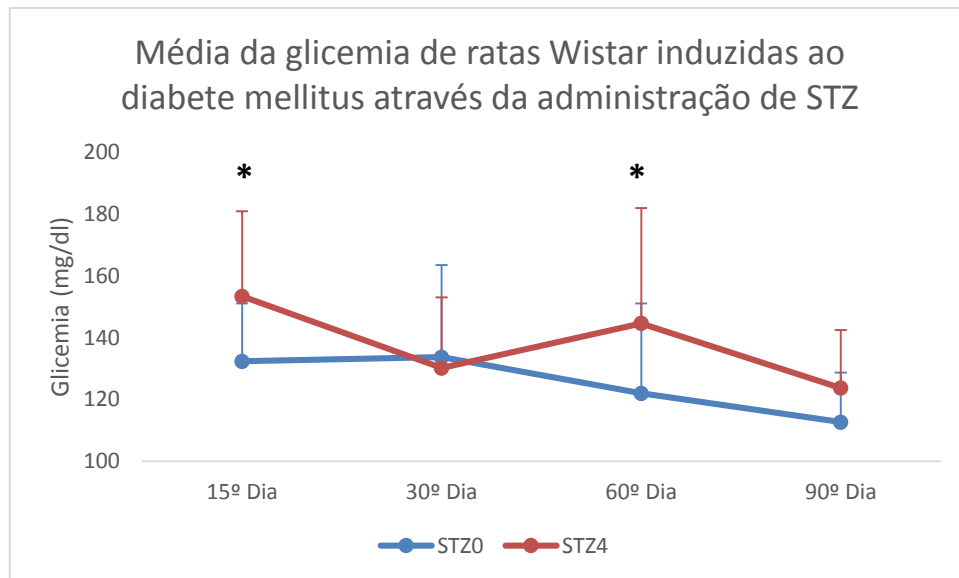


Figura 4 Média e desvio padrão das glicemias de ratos Wistar com DM induzido através da administração de STZ. \* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o mesmo período (Teste t não pareado seguido de correção Welch  $p < 0,05$ ).

### 3.3 Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG) aos 90 dias de vida

A Figura 5 mostra a média e desvios-padrão das glicemias das ratas durante o teste oral de tolerância a glicose aos 90 dias de vida. O grupo com diabetes induzido 4º dia de vida (STZ4) apresentou maior glicemia em todos os pontos excetuando o último, 2 horas depois da administração da sobrecarga de glicose, quando comparado ao grupo STZ0. O primeiro ponto após a administração da carga de glicose (30 minutos) aponta para uma maior intolerância à glicose no grupo induzido no D4 ( $326,08 \pm 92,89$  mg/dL) do que no grupo induzido no D0 ( $272,70 \pm 77,37$  mg/dL). O segundo ponto, após 60 minutos ( $281,47 \pm 92,95$  mg/dL) também mostra o mesmo efeito, o grupo induzido no D4 também apresenta maior dificuldade em controlar a glicemia do que as ratas induzidas no D0 ( $212,48 \pm 79,85$  mg/dL). Já no último ponto, 120 minutos após a aplicação da sobrecarga de glicose, não houve diferença entre os grupos, apesar do grupo induzido no D4 manter a média glicêmica ( $140,91 \pm 53,33$  mg/dL) maior que o grupo induzido no D0 ( $127,54 \pm 47,26$  mg/dL). Houve diferença estatisticamente significativa dentro dos grupos em todos os pontos exceto entre a glicemia de jejum e glicemia após duas



horas da administração da sobrecarga de glicose, mostrando que apesar de intolerantes, os animais são capazes de retornar ao nível glicêmico inicial. Estes dados contribuem com a hipótese de que a regeneração das células beta das ratas STZ4 é menor do que as STZ0. Quando expostas a sobrecarga de glicose, as ratas STZ4 exibem maior dificuldade no controle glicêmico e, portanto, maior intolerância à glicose.

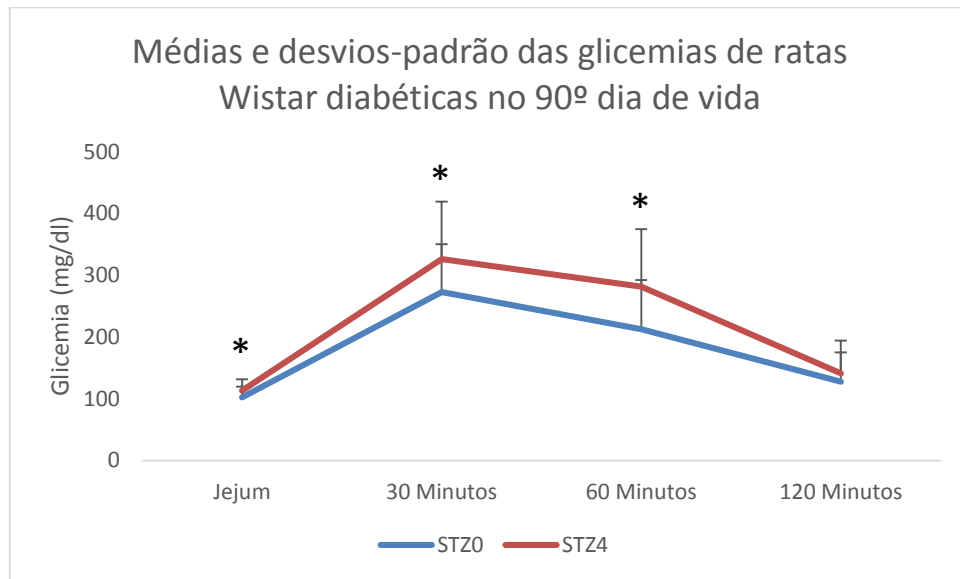


Figura 5 Teste Oral de Tolerância à Glicose realizado no 90º dia de vida de ratas Wistar com Dm induzido no D0 e D4. \* Diferença estatística entre os grupos no mesmo período (Teste t não-pareado seguido de correção Welch  $p < 0,05$ ).

### 3.4 Prenhez

#### 3.4.1 Glicemia

A Figura 6 representa a média glicêmica das ratas durante a prenhez. Não houve diferença entre os grupos nos 4 momentos analisados, dia 0, 7, 14 e 21 de prenhez. As ratas do grupo STZ4/Acas90 apresentaram diminuição da glicemia nos dias 14 e 21 de prenhez comparado ao dia 7 dia de prenhez. Já no grupo STZ0/Acas120, essa diferença iniciou desde o primeiro dia de prenhez, com redução da glicemia nos dias 14 e 21 de prenhez em relação aos dias 0 e 7 de prenhez. A queda da glicemia no final da prenhez pode ser devido ao maior catabolismo no organismo materno para suprir as necessidades crescentes do feto, ou seja, maiores quantidades de glicose sérica materna é translocada pela placenta para o feto. No

19º dia de prenhez, aproximadamente 23% da glicose materna é utilizada pelo concepto (LETURQUE et al., 1986).

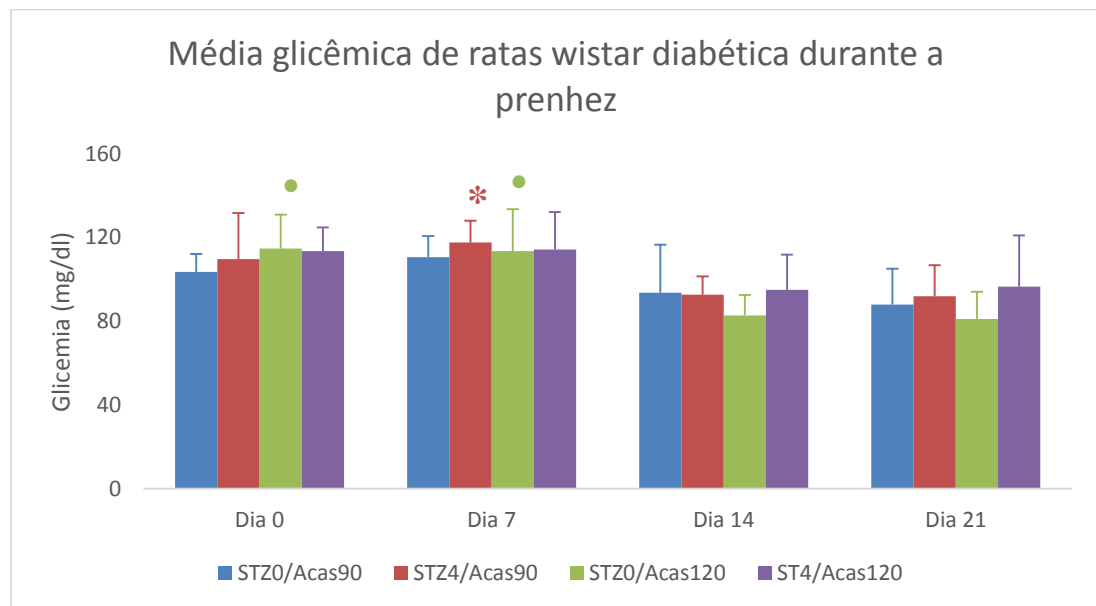
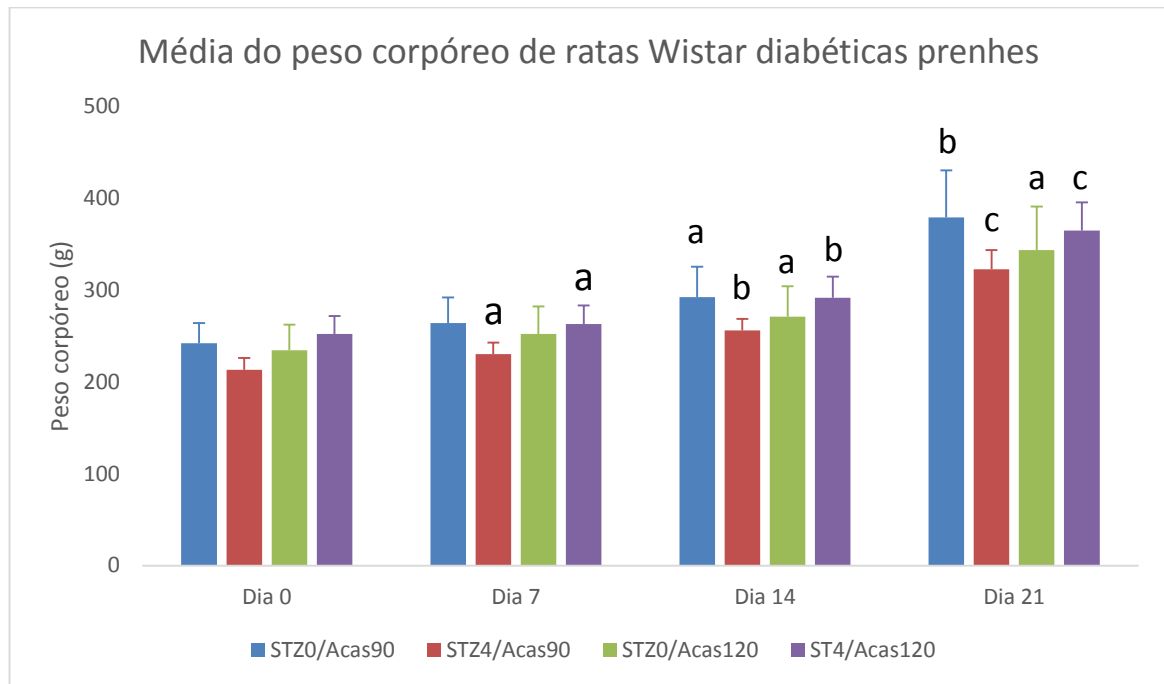


Figura 6 Média e desvio padrão das glicemias de ratas Wistar prenhes em diferentes tipos de indução ao DM. \* Diferença estatisticamente significativa na glicemia do modelo STZ4/Acas90 no sétimo dia quando comparada às glicemias dos dias 14 e 21 de prenhez. • Diferença estatisticamente significativa nas glicemias do modelo STZ0/Acas120 no primeiro e sétimo dia quando comparadas às glicemias dos dias 14 e 21 de prenhez (ANOVA seguido de teste t e correção de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

### 3.4.2 Peso Corpóreo

A Figura 7 ilustra o ganho de peso corpóreo durante a prenhez das ratas induzidas ao DM pelos diferentes modelos. Não houve diferença entre os grupos para o mesmo período. No modelo STZ0/Acas90, o peso corpóreo foi constante desde o primeiro dia de gestação ( $242 \pm 21,95$  g) até o sétimo dia ( $264 \pm 27,95$  g). E então, mostrou um aumento significativo no dia 14º dia de prenhez ( $292,14 \pm 33,31$  g) em relação à primeira semana e no 21º dia de prenhez ( $379,14 \pm 50,96$  g) em relação aos outros três períodos. No grupo STZ4/Acas90 houve aumento significativo em todos os dias em relação aos períodos anteriores: dia 0 ( $213,42 \pm 12,85$  g), dia 7 ( $230,28 \pm 12,62$  g), dia 14 ( $255,85 \pm 12,65$  g) e dia 21 de prenhez ( $322,42 \pm 21,01$  g). No grupo STZ4/Acas120 o aumento foi gradual como STZ4/Acas90: dia 0 ( $252,08 \pm 19,43$  g), dia 7 ( $263,11 \pm 20,08$  g), dia 14 ( $291,58 \pm 22,88$  g) e dia 21 de prenhez ( $364,7 \pm 30,66$  g). No grupo STZ0/Acas120 entre os dias 0 ( $234,42 \pm 27,84$  g) e 7 ( $252,28 \pm 29,75$  g) e do 14 ( $271 \pm 33,04$  g) ao 21 ( $343,42 \pm 47,50$  g) não houve

diferença, porém, houve aumento entre estes períodos, ou seja, da primeira à última semana de gestação.



*Figura 7 Médias e desvios-padrão do peso corpóreo de ratas Wistar com DM induzido por diferentes modelos. Não houve diferença entre os grupos para o mesmo período. As letras representam diferenças entre os períodos no mesmo grupo. No modelo STZ0/Acas90: <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa da glicemia do dia 14 comparada as glicemias dos dias 0 e 7 de prenhez. <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa do 21º dia de prenhez comparado a todos os outros períodos. Nos modelos STZ4/Acas90 e STZ4/Acas120: <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa da glicemia do dia 7 quando comparadas as glicemias dos outros três períodos. <sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa da glicemia do dia 14 quando comparadas as glicemias dos outros três períodos. <sup>c</sup> Diferença estatisticamente significativa da glicemia do dia 21 quando comparadas as glicemias dos outros três períodos. No modelo STZ0/Acas120: <sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa das glicemias dos dias 14 e 21 quando comparadas as glicemias dos dias 0 e 7 (ANOVA paramétrico seguido de teste t e correção de Bonferroni para  $p < 0,05$ ).*

### 3.4.3 Consumo de água e ração

O consumo de água e ração pelos animais pode indicar alterações metabólicas importantes para os modelos estudados. A ingestão limitada de líquidos e alimentos podem indicar intoxicação, dor, infecção entre outros. Por outro lado, a polifagia e polidipsia são sintomas frequentemente encontrados no diabetes. A polifagia é resultado da translocação ineficiente da glicose extracelular para o meio intracelular, gerando estado de jejum relativo. A polidipsia ocorre quando a

concentração de glicose no sangue causa a poliúria, levando o indivíduo a sentir mais sede pela perda de água (MURALI, B.; GOYAL, 2001).

A Figura 8 ilustra o consumo de ração das ratas durante a prenhez. Apenas no quinto dia de prenhez houve diferença entre os grupos, o grupo STZ0/Acas90 ( $24,48 \pm 2,36$  g) apresentou maior no consumo de ração em relação ao modelo STZ0/Acas120 ( $18,53 \pm 5,58$  g). Na variação dentro dos modelos, os STZ0/Acas90 e STZ4/Acas90 apresentaram maior consumo de ração no 17º em relação a todos os outros períodos dentro do mesmo grupo, nos modelos STZ0/Acas120 e STZ4/Acas120 esse aumento foi significativo apenas quando comparado ao dia 2 e 5 de prenhez do mesmo grupo. O aumento do consumo no 17º dia pode ser explicado pela aplicação do teste oral de tolerância à glicose no mesmo dia. O consumo de ração foi mensurado após o teste, que necessita que os animais fiquem em jejum por 6 horas. O teste de resistência à insulina exige o mesmo período em jejum, porém é aplicado no 15º dia de prenhez, quando o consumo de ração não é avaliado.

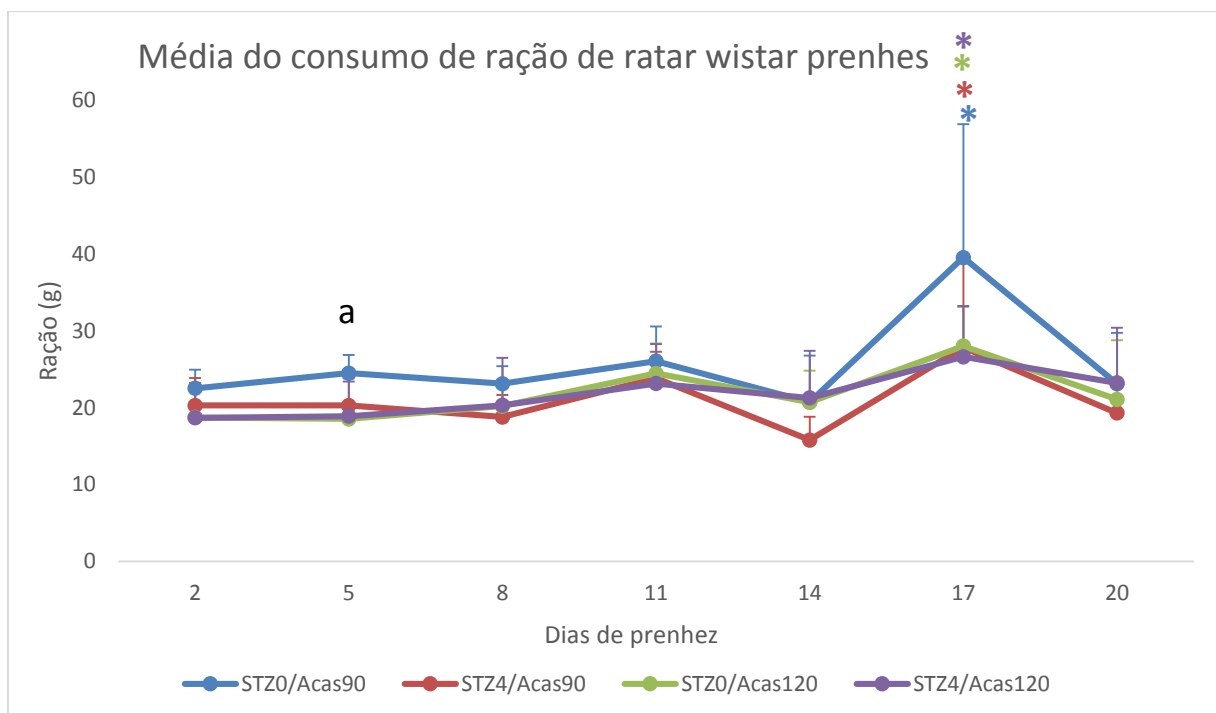
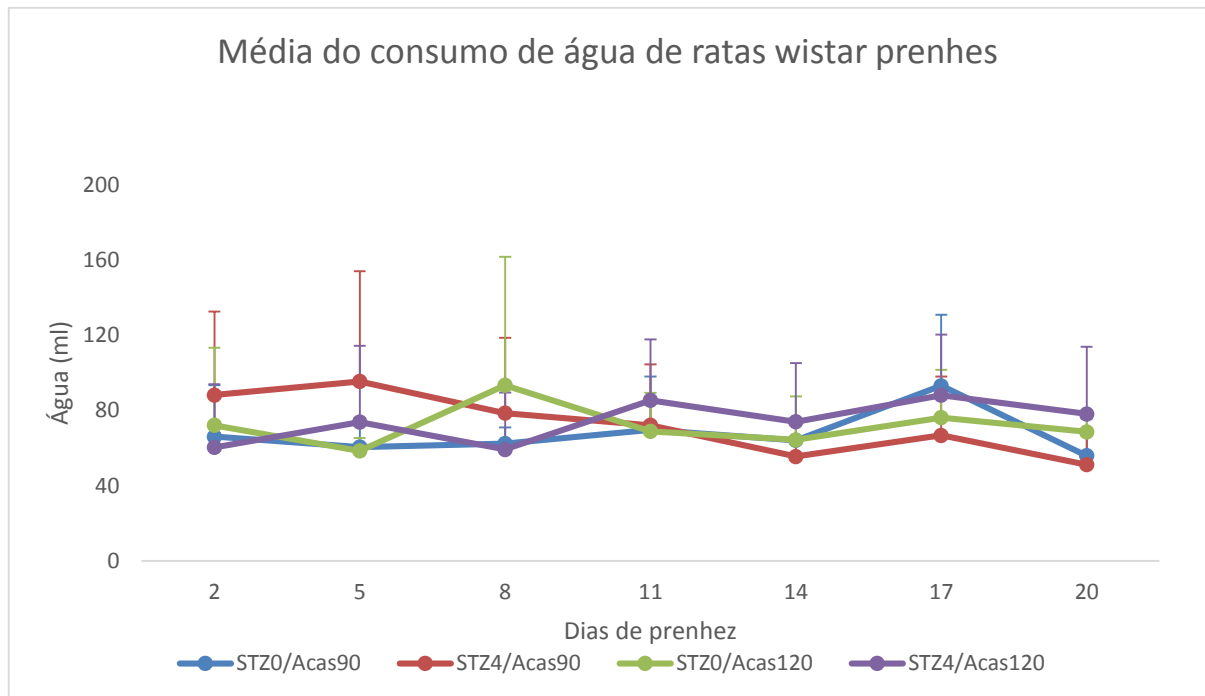


Figura 8 Média e desvio padrão do consumo de ração por ratas Wistar prenhes com DM induzido. Nos grupos STZ0/Acas90 e STZ4/Acas90: \*Diferença estatística entre o consumo do 17º dia de prenhez e todos os outros. Nos grupos STZ0/Acas120 e STZ4/Acas120 \*Diferença estatística entre o consumo do 17º dia quando comparado aos dias 2 e 5 de prenhez. a Diferença estatística entre a

*glicemia do grupo STZ0/Acas90 e do grupo STZ0/Acas120 no 5º dia de prenhez (ANOVA seguido de teste t e correção de Bonferroni  $p < 0,05$ )*

O volume de água consumido pelos animais permaneceu inalterado, como mostra a Figura 9, durante todo o período de prenhez nos quatro modelos testados. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa desse parâmetro entre os quatro grupos para o mesmo período.



*Figura 9 Média e desvio padrão do consumo de água por ratar Wistar induzidas ao DM durante a prenhez ( $p > 0,05$ ).*

#### 3.4.4 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Durante o teste oral de tolerância à glicose no 17º dia de prenhez não houve diferença entre os grupos em cada ponto de registro da glicemia, como mostra a Figura 10. Houve diferença entre todos os pontos dentro do mesmo grupo, exceto entre o jejum e 120 minutos após a aplicação da sobrecarga de glicose, para todos os modelos. A maior intolerância à glicose encontrada nos grupos STZ4 em relação ao STZ0 no TOTG no 90º dia de vida não se manteve durante a prenhez. Mesmo assim, todos os grupos apresentaram intolerância à glicose, caracterizada por dois pontos de glicemia iguais ou maiores a 140mg/dl na curva.

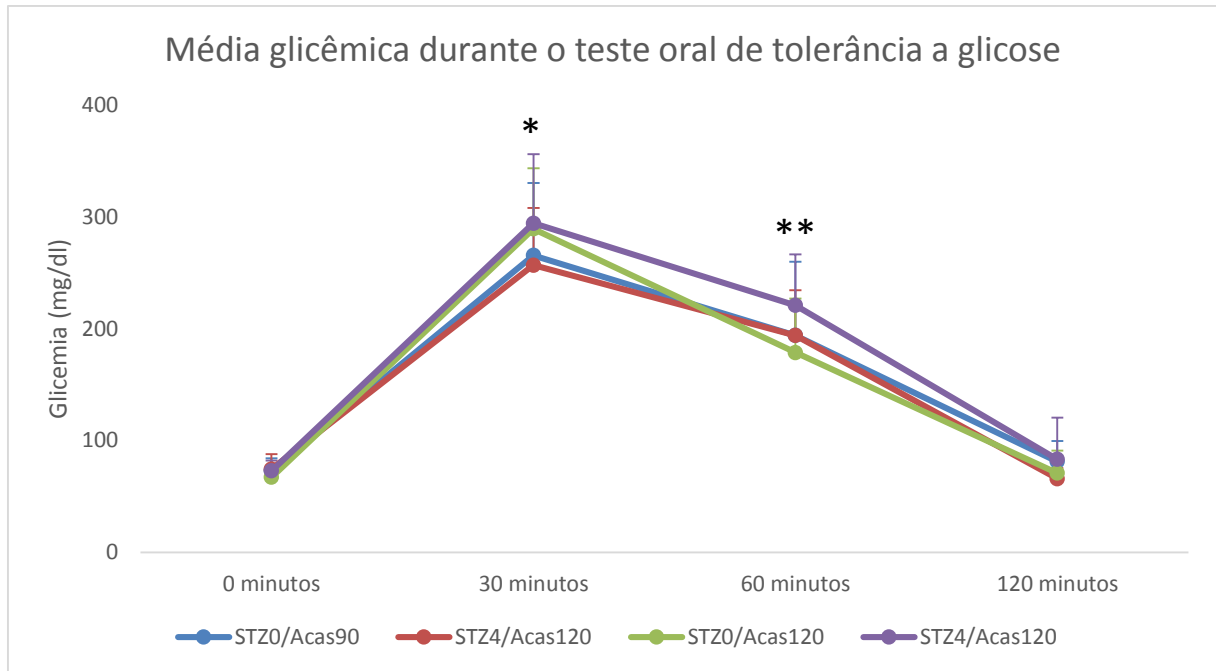


Figura 10 Média e desvio padrão da glicemia de ratos Wistar diabéticos prenhes durante o teste oral de tolerância a glicose. \*Diferença estatisticamente significativa entre os modelos para o mesmo período (ANOVA seguido de teste t e correção de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

### 3.4.5 Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

No teste de tolerância insulínica não houve diferença entre os grupos no mesmo período, como mostra a Figura 11. No modelo STZ0/Acas90, 15 minutos ( $87,28 \pm 8,51$  mg/dL) após a aplicação de insulina subcutânea, a glicemia foi maior do que 60 minutos ( $66,14 \pm 16,65$  mg/dL) após a aplicação. Este fato pode ser explicado pelo estresse gerado nos animais após a manipulação dos mesmos. No modelo STZ4/Acas90, a glicemia foi reduzida 60 minutos ( $60,57 \pm 12,84$  mg/dL) após a aplicação da insulina em relação à glicemia de jejum ( $73,28 \pm 7,47$  mg/dL). Este resultado é esperado para animais que não possuem grande resistência periférica à insulina, ou seja, nestes animais a insulina agiu nos tecidos e permitiu a passagem da glicose da corrente sanguínea para o interior das células, reduzindo o nível de glicose sérica. No modelo STZ0/Acas120 não houve diferença estatisticamente significativa entre os pontos de medida do teste. Já no modelo STZ4/Acas120, todos os pontos jejum ( $74,08 \pm 6,3$  mg/dL), 30 minutos ( $67,58 \pm 13,39$  mg/dL), 60 minutos ( $66,66 \pm 8,08$  mg/dL) e 120 minutos ( $71,33 \pm 8,26$  mg/dL) mostraram uma glicemia menor do que aos 15 minutos ( $85,58 \pm 15,51$  mg/dL) pós-administração da insulina. Este aumento aos 15 minutos pode ser explicado da mesma forma do modelo

STZ0/Acas90, os animais apresentam maior glicemia devido aos efeitos causados pelo estresse e liberação de hormônios suprarrenais, como o cortisol.

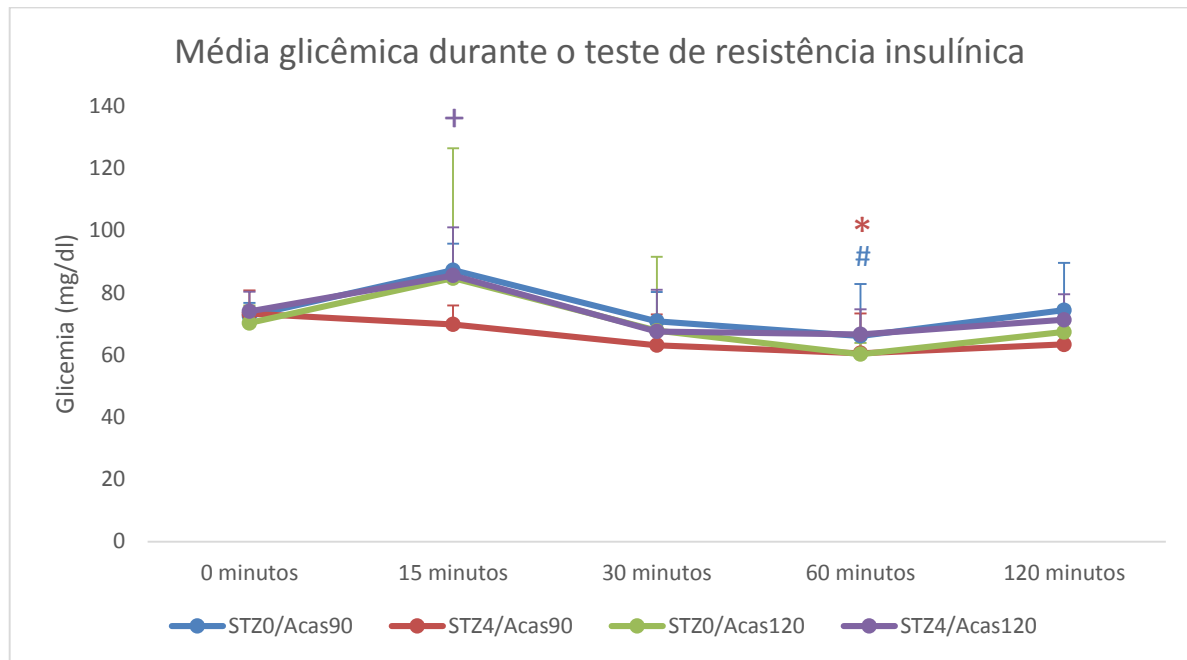


Figura 11 Média e desvio padrão da glicemia de ratos Wistar diabéticos prenhes durante o teste de tolerância à insulina. # Diferença estatisticamente significativa da glicemia 60 minutos após a aplicação de insulina quando comparada com a glicemia 15 minutos após a aplicação de insulina no grupo STZ0/Acas90 \* Diferença estatisticamente significativa da glicemia 60 minutos após a aplicação de insulina quando comparada a glicemia de jejum no grupo STZ4/Acas90. + Diferença estatisticamente significativa entre a glicemia 15 minutos após a aplicação de insulina e todos os outros pontos do grupo STZ4/Acas120 (ANOVA paramétrico seguido de teste t e correção de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

### 3.5 Desempenho reprodutivo materno

Não houve diferença estatisticamente significativa no desempenho reprodutivo materno entre os modelos testados (Tabela 1). Porém, o número de ratas que apresentaram perda pós-implantação entre os grupos foi diferente. Apenas 26% das ratas dos modelos STZ0 somados mostraram perda. Nos modelos STZ4 essa taxa foi de 70%, mostrando que o tratamento com STZ no quarto dia pode levar a alterações metabólicas que prejudicam o desenvolvimento embrionário.

Tabela 1. Desempenho reprodutivo materno de ratas Wistar com DM induzidos por diferentes modelos.

	STZ0/Acas90	STZ4/Acas90	STZ0/Acas120	STZ4/Acas120
<b>GP Materno</b>	137,14±32,68	109,14±15,78	107,88±27,11	114,00±17,74
<b>Implantação</b>	12,57±2,57	11,14±2,34	10,88±1,81	11,85±1,57
<b>Reabsorção</b>	0,57±1,13	0,86±0,69	0,38±0,74	1,08±1,32
<b>Corpos Lúteos</b>	13,71±2,56	12,14±1,68	12,33±1,51	13,08±2,19
<b>Nº Fetos Vivos</b>	12,00±3,06	10,29±2,36	10,50±2,39	10,62±1,71
<b>Perda Pré (%)</b>	7,82	8,07	13,35	8,82
<b>Perda Pós (%)</b>	5,18	8,02	4,34	10,33
<b>Peso Ninhada</b>	85,04±23,94	72,28±15,44	71,62±17,93	72,02±10,28

### 3.6 Peso Fetal e Eficácia placentária

O peso fetal foi classificado em pequeno (PIP), adequado (AIP) ou grande (GIP) para a idade de prenhez (Merzouk et al., 2000). A distribuição dos fetos de cada modelo de acordo com essa classificação é apresentada na Figura 12. Nos quatro modelos testados, a maioria dos fetos foi classificada em AIP. Entretanto, houve aumento expressivo na quantidade de fetos PIP nos modelos STZ0/Acas120 (37%) e STZ4/Acas120 (45%), praticamente equiparando-se ao número de fetos AIP do quarto modelo (55%). Além disso, a comparação das médias dos pesos dos fetos entre os grupos (dados não apresentados) mostra que o peso dos fetos no modelo STZ0/Acas90 é significativamente maior do que no modelo STZ0/Acas120, e que os pesos no modelo STZ4/Acas90 são maiores do que no modelo STZ4/Acas120. Tais



resultados, somados ao fato deste grupo apresentar menos eficácia placentária, ver Figura 13, sugere a ocorrência de maior restrição fetal no modelo STZ4/Acas120.

A Figura 13 mostra a eficácia placentária de cada um dos modelos de indução ao diabetes mellitus. O grupo STZ4/Acas120 mostrou menor eficácia placentária quando comparado aos outros três modelos. A hiperglicemia pode alterar o desenvolvimento adequado da placenta e comprometer as trocas materno-fetais gerando uma condição conhecida como Restrição do Crescimento Intrauterino (RCIU). A RCIU é uma das principais causas de fetos abaixo o peso ideal para a idade gestacional e pode ser consequência do tratamento com STZ (URIU-HARE et al., 1985). Portanto, os resultados mostram que a ocorrência de restrição de crescimento intrauterino no modelo STZ4/Acas120 está relacionada à insuficiência placentária.

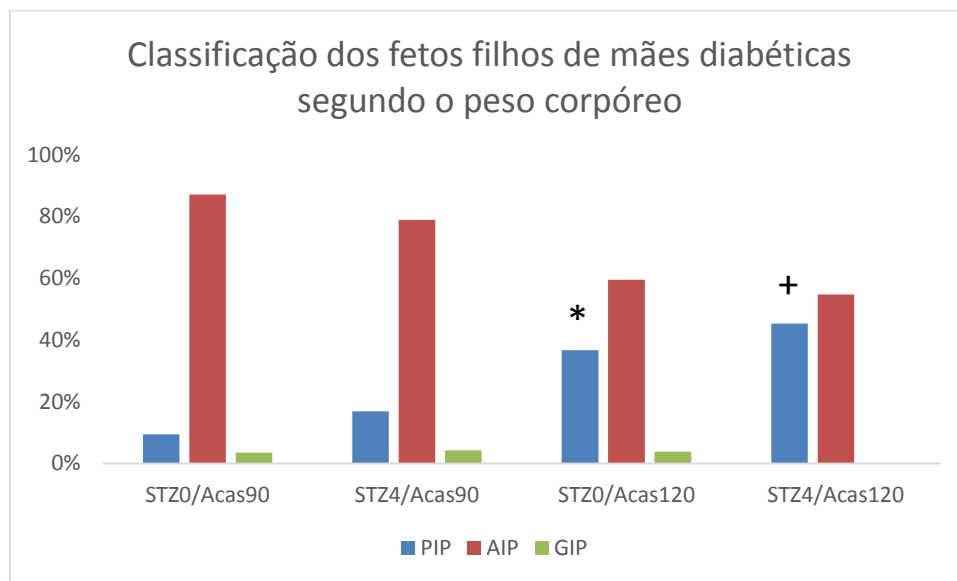


Figura 12 Porcentagem de fetos PIP (Pequeno para Idade de Prenhez), AIP (Adequado para Idade de Prenhez) e GIP (Grande para Idade de Prenhez) dentro de cada modelo de indução do DM. \* Diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de fetos PIP no modelo STZ0/Acas120 quando comparado ao modelo STZ0/Acas90. + Diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de fetos PIP no modelo Acas120/ST4 quando comparado ao modelo STZ4/Acas90. (Qui-quadrado  $p < 0,05$ )

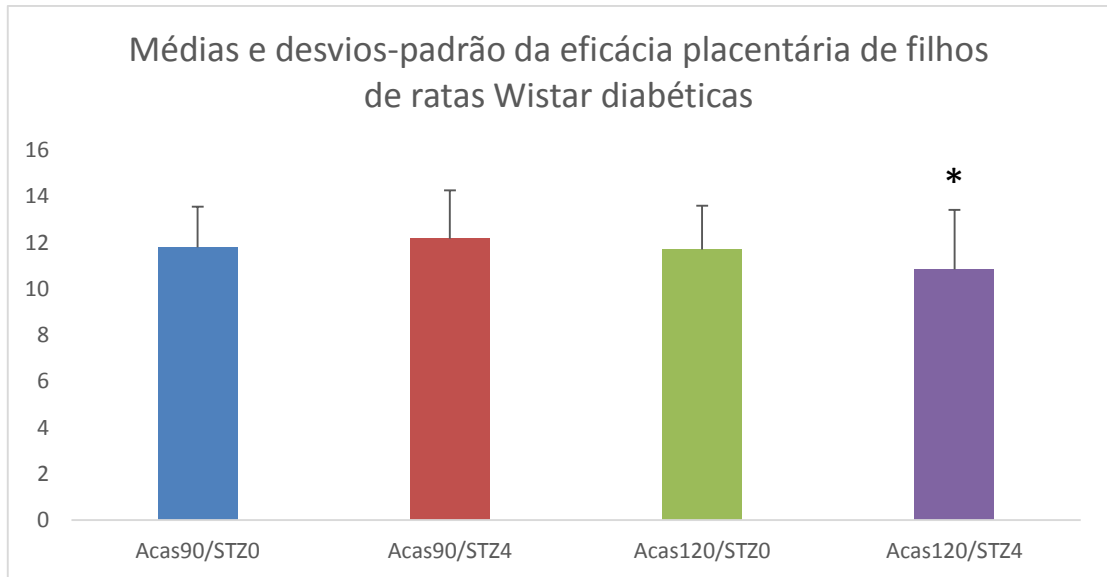


Figura 13 Média e desvio padrão do índice placentário de filhos de ratas Wistar submetidas a diferentes modelos de indução do diabetes mellitus gestacional. \* Diferença estatisticamente significativa entre o STZ4/Acas120 e os outros três modelos (ANOVA não paramétrico seguido de teste t e correção de Bonferroni para  $p < 0,05$ ).

#### 4. Conclusão

A indução no D4 se mostrou mais eficiente por apresentar maior intolerância à glicose no TOTG aos 90 dias, indicando menor taxa de regeneração da massa de células beta. Além disso, o grupo induzido no D4 apresentou menor perda de animais após o tratamento com STZ. Os parâmetros maternos durante a gestação não variaram entre os grupos, porém a perda pós-implantação foi maior nos animais induzidos no D4. Os parâmetros fetais também sofreram alteração. O modelo STZ4/Acas120 mostrou maior número de fetos pequenos para idade de prenhez e menor eficiência placentária, sugerindo que os fetos deste modelo sofram de maior restrição de crescimento intrauterino. Portanto, o modelo de indução ao diabetes no D4 com acasalamento aos 4 meses (STZ4/Acas120) mostrou-se mais representativo em relação aos parâmetros encontrados no DMG clínico.

## Referências

- AMERICAN ASSOCIATION OF DIABETES. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. **Diabetes**, v. 28, n. 12, p. 1039–1057, 2014. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/28/12/1039.short>>. Acesso em: 14/11/2014.
- BONNER-WEIR, S.; TRENT, D. F.; HONEY, R. N.; WEIR, G. C. Responses of Neonatal Rat Islets to Streptozotocin: Limited B-Cell Regeneration and Hyperglycemia. **Diabetes**, v. 30, n. 1, p. 64–69, 1981. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/30/1/64.short>>. Acesso em: 3/12/2014.
- BONNER-WEIR, S.; WEIR, G. C. New sources of pancreatic beta-cells. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 857–61, 2005. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt1115>>. Acesso em: 17/11/2014.
- DAMASCENO, D.; KEMPINAS, W.; VOLPATO, G.; et al. Anomalias Congenitas: Estudos Experimentais. **1ed. Coopmed**, 2008.
- H, M.; S, M.; D, C. S.; et al. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. , 2000. Portland Press Ltd. Disponível em: <<http://www.clinsci.org/cs/098/cs0980021.htm>>. Acesso em: 3/12/2014.
- IESSI, I.; BUENO, A.; SINZATO, Y.; et al. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. **Diabetol Metab Syndr.**, v. 37, 2010.
- KISS, A.; LIMA, P.; SINZATO, Y.; et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. **Diabetol Metab Syndr.**, 2009.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–26, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087688>>. Acesso em: 17/7/2014.
- LETURQUE, A.; FERRE, P.; BURNOL, A.-F.; et al. Glucose Utilization Rates and Insulin Sensitivity In Vivo in Tissues of Virgin and Pregnant Rats. **Diabetes**, v. 35, n. 2, p. 172–177, 1986. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/35/2/172.abstract>>. Acesso em: 3/12/2014.
- MINAMI, K.; SEINO, S. [Regeneration of the pancreas]. **Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**, v. 66, n. 5, p. 926–31, 2008. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/18464512>>. Acesso em: 3/12/2014.
- MURALI, B.; GOYAL, R. K. Improvement in insulin sensitivity by losartan in non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) rats. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 44, n. 5, p. 385–9, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661801908588>>. Acesso em: 3/12/2014.
- MURALI, B.; GOYAL, R. K. EFFECT OF CHRONIC TREATMENT WITH LOSARTAN ON STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC NEPHROPATHY. , 2001. Informa UK Ltd UK. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1081/CEH-100106822>>. Acesso em: 3/12/2014.

NEELAKANDAN, R.; SETHU, P. S. Early universal screening for gestational diabetes mellitus. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 8, n. 4, p. OC12–4, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4064925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10/7/2014.

PORTHA, B.; KERGOAT, M. Dynamics of Glucose-induced Insulin Release During the Spontaneous Remission of Streptozocin Diabetes Induced in the Newborn Rat. **Diabetes**, v. 34, n. 6, p. 574–579, 1985. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/34/6/574.short>>. Acesso em: 3/12/2014.

PORTHA, B.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. **Diabetologia**, v. 17, n. 6, p. 371–377, 1979. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01236272>>. Acesso em: 3/12/2014.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 212, n. 2, p. 167–78, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X06000287>>. Acesso em: 13/11/2014.

RYAN, E. A.; ENNS, L. Role of Gestational Hormones in the Induction of Insulin Resistance: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism: Vol 67, No 2. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/jcem-67-2-341>>. Acesso em: 10/7/2014.

SINZATO, Y. K. [UNESP]. Análise morfológica e imunológica das placentas de ratas com diabete de intensidade moderada. , 27. Feb. 2009. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Disponível em: <<http://base.repositorio.unesp.br/handle/11449/106385>>. Acesso em: 3/12/2014.

SINZATO, Y. K.; DAMASCENO, D. C.; LAUFER-AMORIM, R.; et al. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumornecrosis factor- $\alpha$  as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 206–211, 2011. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2011000300005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2011000300005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 3/12/2014.

URIU-HARE, J. Y.; STERN, J.; REAVEN, G. M.; KEEN, C. L. The Effect of Maternal Diabetes on Trace Element Status and Fetal Development in the Rat. **Diabetes**, v. 34, n. 10, p. 1031–1040, 1985. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/34/10/1031.short>>. Acesso em: 3/12/2014.

WANG, R. N.; BOUWENS, L.; KLÖPPEL, G. Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period. **Diabetologia**, v. 39, n. 5, p. 548–557, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00403301>>. Acesso em: 3/12/2014.